

筑波大学

博士(医学)学位論文

新規ハイドロゲル製剤による腓液瘻予防効果の検討

2020

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

鈕持 明

目次

1. 緒言	1
2. 実験材料と方法	4
2-1. ハイドロゲルの調製	
2-2. 対照物質	
2-3. 実験動物	
2-4. 群分類	
2-5. 術式	
2-6. 腹水の解析	
2-7. 病理組織学的検討	
2-8. 膨潤試験	
2-9. 膜透過性試験	
2-10. ハイドロゲルの長期留置	
2-11. 統計解析	
3. 結果	16
3-1. 膵液瘻ラットモデルの作製と検証	
3-2. 術後48時間の再開腹所見	
3-3. 物質による膵液瘻予防効果の比較	
3-4. 血液中の炎症反応および膵酵素の評価	

3-5. 免疫組織化学染色による病理組織学的検討	
3-6. 膨潤試験	
3-7. アミラーゼの挙動	
3-8. ハイドロゲル長期留置の安全性の評価	
4. 考察	24
4-1. これまでの膵液瘻予防と新たな着想	
4-2. 膵液瘻ラットモデル	
4-3. 鹼化と炎症の抑制	
4-4. ハイドロゲルの特徴と膵液瘻予防の仕組み	
4-5. 本研究の問題点	
5. 結論	34
6. 図表	35
7. 謝辞	52
8. 出典	53
9. 参考文献	54

1. 緒言

膵癌は早期における臨床症状、自覚症状の乏しさから診断時の半数以上が進行癌として認められる。既に切除不能症例である場合や、また切除症例においても早期に肝臓や腹膜への遠隔転移を認め、その予後は不良で5年生存率はおよそ5%と難治性癌の代表とされる。難治性である膵癌の治療において、近年は手術、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、外科手術による切除はその中核を成しており、治療成績の向上において重要である。膵切除術後の死亡率は、近年5%未満となり減少してきてはいるものの、合併症の発生率は依然として高率である。その中でも、膵切除術後の膵液瘻は主要な合併症である。既報によると、膵液瘻の発生率は膵頭十二指腸切除術後で2-45%であり、膵体尾部切除術後で20-50%と示されている(1-9)。膵液瘻の発生により、周囲の臓器や血管は溶解され、結果として感染や出血を引き起こし、入院期間の延長や死亡につながる危険性がある(10, 11)。膵液瘻の予防は膵臓手術において最重要課題といえるが、手術の方法の改良や技術の進歩、道具の進化はもはや限界であり、新たな試みが必要な領域といえる(12)。近年、間葉系幹細胞シートを使用して膵液瘻の予防を行うといった研究が報告されている(13-15)。しかしながら、悪性腫瘍に対する膵切除術においては残存腫瘍細胞の増殖を促すリスクがある。シーラントを使用した膵液瘻予防

法の報告もあるが、シーラントはその形状から扱いづらく、用途の幅が狭い
(16)。腭液瘻の予防法には有効な手段はこれまで開発されておらず、研究途上
にあり、その上でも定まった方法は存在しない。

近年、様々な分野において、液体と固体の両方の性質を有する
「ゲル」が注目されている。ゲルとは高分子からなる三次元網目様構造の間隙
に、親水性あるいは疎水性の溶媒を取り込むことが可能な半固形物質の一種で
あり、ゲル内の液相の種類により、水を含有するハイドロゲル、有機溶媒を含
有するオルガノゲル等に分類される。その中でもハイドロゲルは三次元網目様
構造の中に多量の水分を保持することが可能で、農園芸用の土壌保水材や紙お
むつ等の衛生・生理用品などの日用品から、創傷被覆材やコンタクトレンズな
どの医療分野への応用もなされている。このようにハイドロゲルは多くの可能
性を持つ物質であり、調製方法により物性を変化させることが可能なため腭液
瘻予防に適した物質と考えた。本研究では、様々な調製方法にてハイドロゲル
が調製可能で、かつ多様な性質を有する高分子であるポリビニルアルコール
(PVA) に着目した(17-21)。PVAは合成高分子の一種でありながら、水に溶解
するという性質を有する。PVAのもつ造膜性、接着性、乳化性、耐油性、耐酸
性、耐塩基性、耐薬品性などの特徴と高い生体適合性を活かして、ソフトコン
タクトレンズや創傷被覆材として販売され、癒着防止剤としての応用について
も研究がなされている(17-21)。

私は、東京理科大学薬学研究科と共同研究を行い、腭液癭予防に適した物性をもったハイドロゲル製剤の調製に成功した。PVAから調製したハイドロゲルシートでの腭液癭予防法の報告はこれまでのところ存在しない。本研究の目的は、新たに開発したハイドロゲルシートの腭液癭予防効果の検証である。

2. 実験材料と方法

2-1. ハイドロゲルの調製

ポリビニルアルコール(PVA)は、生体適合性が高く、耐酸性、耐塩基性、耐薬品性に優れた合成高分子である。PVAはハイドロゲル化することができ、眼科学分野ではソフトコンタクトレンズ、皮膚科学分野での創傷被覆材として臨床で利用もされている。本研究では、PVAの一種であるExceval® (RS-2117, 株式会社クラレ)を使用してハイドロゲルを調製した。4種の濃度(2.5%、5.0%、7.5%、10%)の質量パーセント濃度になるように超純水にExceval®を添加したのちに加温し、溶解させた。ステンレス製のペトリ皿に分注し、-20°Cで18時間凍結させ、35°Cで6時間融解のプロセスを1サイクルとした(Figure 1)。これを1~4回繰り返すことにより、種々の条件の異なる調製を行い、膝液瘻予防に適したハイドロゲルシートを調製した(Figure 2、Table 1)。各群で調整されたハイドロゲルの物性調査と、後述する動物実験に用いた結果からExceval®の質量パーセント濃度10%で凍結融解を2サイクル施行したものを本研究の実験に用いることとした。ハイドロゲルを凍結乾燥(-80°Cで凍結した後、室温で24時間乾燥)させクライオゲルとし、走査型電子顕微鏡(SEM, JSM-6390LA, 日本電子株式会社)を用いて、加速電圧20kV、倍率500倍で観察した(Figure 3)。Exceval®の密な架橋が観察できた。

2-2. 対照物質

今回開発したハイドロゲルシートの有効性を検証するため、2種類の比較対照物質を使用した。VIEWGEL® (大鵬薬品工業株式会社)は創傷被覆材として販売されているハイドロゲルシートで、吸収性のハイドロゲル層と非吸収性のポリエチレンフィルムの2層で構成されている (Figure. 4)。市販のハイドロゲルとして、今回開発したハイドロゲルシートのハイドロゲル同士の比較対象とした。

Neoveil® (ゲンゼ株式会社)はポリグリコール酸 (PGA) を材料とした吸収性組織補強材であり、組織の運動や凹凸に追従する伸縮性を持つソフトな不織布である。腸管吻合部や肺の切除断端の補強に長年用いられてきた実績があり、昨今は臨床的に臍切離断端の補強として使用されている医療材料である (Figure 4)。トライステーブルTM2.0リンフォースという名称で臍切除に用いる自動縫合器も近年は多くの施設で使用されている。ハイドロゲルではないが、現在最も用いられている臍液瘻予防剤であるため比較対象とした。

2-3. 実験動物

体重160gから190gの6週齢のSprague Dawley (SD)ラットを

Charles-Rivers Laboratories (日本)から購入し、実験を開始する前に環境に1週間順応させた。これまでのところ、腓液瘻の発生率に性差があるという報告はなく、性周期によらずに歩留まりの良い結果を得るために雄性ラットを選択した。ラットは、温度、湿度、および換気が制御された飼育室に收容され、特定の無菌条件下で12時間の明暗サイクルで飼育された。動物実験は、筑波大学動物実験委員会の承認を得て、人道的に実施し、プロトコルは、同大学の「動物実験に関する規定」および「動物実験の適正実施のための基本的ガイドライン」および学術活動における基本的ガイドライン」に準じた。

2-4. 群分類

ラットは4群に分類し、実験を行った。すべてのラットは脾動静脈を温存しつつ、膵臓および膵管を切離された。①膵切離のみのコントロール群 (n=16)、②膵切離部位にVIEWGEL®を貼付した群 (n=8)、③膵切離部位にNeoveil®を貼付した群 (n=16)、④膵切離部位にハイドロゲルシートを貼付した群 (n=16)の4群に分けた。

2-5. 術式

麻酔器を用いてイソフルランでラットに全身麻酔をかけた。ラットは仰臥位で上腹部正中切開を行い開腹した。手術台にコルクボードを設置し、四肢を十分に伸展させた状態でテープおよびピンで四肢をコルクボードに固定した。体位は仰臥位とした。腹部を剃毛し、エタノールで皮膚消毒を施行した後に眼科剪刀を用いて上腹部正中切開で開腹し、即座に5mLの生理食塩水を腹腔内に注入し、十分に振盪させた上で回収した。左上腹部の脾臓をメルクマールとして胃および後腹膜からの生理的線維性癒着を眼科剪刀を用いて鋭的に剥離した。操作性の確保のため、大網も十分に剥離を行い、膵脾脱転を十分に施行した。膵切離については、膵への血流の確保のため脾動静脈の走行を十分に確認し、モスキート鉗子を用いて剥離を行うとともに5-0絹糸で脾動静脈をテーピングして温存した。ラットの膵管は胃管、十二指腸管、総管、脾管の4つから成る(13)。脾動静脈を温存しつつ、膵液瘻を誘発させるために膵実質および膵管(脾管)を切離した。膵切離の後に、ハイドロゲルシートを膵切離部位に貼付した(Figure5)。術後48時間ですべてのラットを再開腹した。腹腔内を5mLの生理食塩水で洗浄した後に回収し、膵酵素値を測定した。ラットの膵臓および脾臓は貼付剤とともに摘出した。

2-6. 腹水および血液の解析

腹水中および血液中のアミラーゼの値およびリパーゼの値は動物用臨床化学分析装置である富士ドライケム7000V (富士フイルムホールディングス株式会社)を用いて測定した。

血球数は全自動血球計数器 MEK-6500シリーズ セルタック α (日本光電株式会社) を用いて測定した。

2-7. 病理組織学的検討

術後48時間で再開腹し、各群の膵組織を摘出した。10%ホルムアルデヒドで組織を固定し、パラフィンに包埋した。3 μ mに薄切し、ヘマトキシリン-エオジン (H.E)で染色し、観察スライドを作製した。パラフィンプロック作製、および薄切工程については、筑波大学組織標本作製室に依頼し、著者同席のもと行った。作製されたスライドで、各群の切離断端の炎症細胞数を無作為に選出した20視野で高倍率視野($\times 400$)で計測した。炎症細胞浸潤は著者自身が好中球数をカウントした。好中球の判断基準として、2核から4核の多形核白血球かつ、好酸性顆粒が明らかなものは好酸球として除外し、単核のものもリンパ球として除外した。免疫組織化学的検討として、炎症性サイトカインであるIL-6(1:8000, ab9324, Abcam, Cambridge, MA)を用いて免疫染色を行った。免疫染色の工程を以下に示す。

1. 【脱パラフィン】キシレンに10分浸漬する。
2. 【水和】 A.100%エタノールで10分間、2回インキュベートする。
B. 95%エタノールで10分間、2回インキュベートする。
C.精製水で5分間、2回洗浄する。
3. 【抗原賦活化】 10mMクエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) 中でスライドを121 $^{\circ}$ C10分間維持する。実験台上でスライドを30分~2時間冷却する。
4. 【洗浄】 PBSで5分間、3回洗浄する。その後PBSで5分間、2回洗浄する。

DAKOペンで周囲を囲み、洗浄後0.2%TritonXで5分間浸漬し(22, 23)、透過処理を

行う。PBSで5分間洗浄する。

5.【ブロッキング】ブロッキング液200 μ Lで室温で1時間ブロッキングを行う。

6.【一次抗体】ブロッキング液を除去し、抗体希釈液(PBS)で希釈した(1:8000)一次抗体200 μ Lを各切片に添加し、4 $^{\circ}$ Cで1晩インキュベートする。

7.【洗浄】一次抗体液を除去し、洗浄バッファーで5分間3回洗浄する。

8.【二次抗体】切片を覆うように検出システム(HRP)を滴下(1-3滴)。加湿チャンバー内で室温で30分インキュベートする。

9.【洗浄】洗浄バッファーで5分間3回洗浄する。

10.【発色】DAB200 μ Lを添加し、注意深く観察する。1-10分で十分な染色が得られる。ヘマトキシリンで対比染色を行う。

11.【洗浄】精製水で5分間2回洗浄する。

12.【脱水】95%エタノールで10秒間、2回インキュベートする。100%エタノールで10秒間、2回インキュベートする。キシレンで10秒間、2回インキュベートする。

13.切片に封入剤を添加し、カバーガラスで覆い、終了。

2-8. 膨潤試験

各物質を洗淨後、乾燥させた後に超純水10mLに24時間

浸漬し、膨潤度を測定した。時間経過での膨潤度は、次の式を用いて計算した。

$$\text{「膨潤度} = (W_s - W_d) / W_d\text{」}$$

W_s : 膨潤した物質の重量 (mg)

W_d : 初期の重量 (mg)

2-9. 膜透過性試験

Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA)に準じて、膜透過性試験を行った(24)。サイド-バイ-サイドセル(PermeGear, Inc., PA, USA)はドナーチャンバーとレセプターチャンバーの間に垂直に膜を配置できるガラス製の拡散セルで、内部は大気の遮断された閉鎖腔となっている。

2-10. ハイドロゲルの長期留置

長期間ハイドロゲルを腹腔内に留置した際の安全性の評価のため、げっ歯類の安全性評価の基本である26週間の長期留置を行った。通常の動物実験と同様の条件のSDラットを用いた（n=6）。ハイドロゲルの安全性のみの評価を行うため、臍切離を行わずに臍周囲にハイドロゲルを留置し、1週毎に体重を計測した。

2-11. 統計解析

すべてのデータは平均±標準偏差で表した。統計解析は、GraphPad PRISM Version 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用して行った。2群間の比較には、Mann-Whitney U testを用い、3群以上の比較にはOne-way ANOVAを用いた。P値は0.05未満を有意とした。

3. 結果

3-1. 膵液瘻ラットモデルの作製と検証

2-5. 術式で述べた通りの方法で膵液瘻ラットモデルを作製した。開腹時および初回術後48時間の再開腹時にそれぞれ腹腔内に5mLの生理食塩水を注入して十分に振盪し、濃度を一定にした上で回収し、それぞれアミラーゼ、リパーゼの濃度を測定した。いずれの濃度も再開腹時には有意に上昇していた (Figure 6)。さらに、開腹操作が腹腔内の膵酵素の上昇を来している可能性を除外するため、膵臓の切離を行わず、開閉腹のみの群でも腹水中の膵酵素の値を測定した。開閉腹のみのSham群では膵酵素の上昇はみられなかった (Figure 7)。

3-2. 術後48時間の再開腹所見

術後48時間ですべてのラットを再開腹し、観察を行ってから検体を摘出し、犠死させた。再開腹時の所見としてコントロール群（11/16, 68.8%）、VIEWGEL®群（6/8, 75.0%）、Neoveil®群（8/16, 50.0%）では膵周囲の脂肪織が膵液の蛋白分解酵素により白濁する鹼化の所見を認めたが、ハイドロゲル群では認めなかった（0/16, 0%）(Figure8)。

3-3. 物質による腓液瘻予防効果の比較

術後48時間でのコントロール群、Neoveil®群、VIEWGEL®群、ハイドロゲル群での腹水中のアミラーゼの値はそれぞれ4992.4±5355.7 IU/L、1068.4±269.1 IU/L、730.2±425.2 IU/L、303.1±240.1 IU/Lであった(Figure 9)。腹水中のリパーゼの値はそれぞれ2279.8±3395.2 IU/L、169.5±100.6 IU/L、90.4±71.0 IU/L、86.8±59.8 IU/Lであった(Figure 9)。ハイドロゲル群では、腹水中のアミラーゼの値およびリパーゼの値は最も低値であった($p<0.05$)。

3-4. 血液中の炎症反応および酵素の評価

術前および術後48時間で各群において末梢血中の白血球数、血清中のアミラーゼ、リパーゼを測定した。術前、コントロール群、Neoveil®群、VIEWGEL®群、ハイドロゲル群における白血球数はそれぞれ $9398.2 \pm 3219.9 /\mu\text{L}$ 、 $10716.7 \pm 2969.7 /\mu\text{L}$ 、 $12900.0 \pm 1871.4 /\mu\text{L}$ 、 $9484.2 \pm 2359.9 /\mu\text{L}$ 、 $11522.2 \pm 4293.2 /\mu\text{L}$ であった(Figure 10)。術前、コントロール群、Neoveil®群、VIEWGEL®群、ハイドロゲル群における血清中のアミラーゼの値はそれぞれ $1707.3 \pm 283.7 /\text{IU/L}$ 、 $2205.6 \pm 626.9 /\text{IU/L}$ 、 $1758.1 \pm 133.6 /\text{IU/L}$ 、 $1913.4 \pm 353.2 /\text{IU/L}$ 、 $1698.5 \pm 373.3 /\text{IU/L}$ であり、リパーゼの値はそれぞれ $46.3 \pm 27.5 /\text{IU/L}$ 、 $253.6 \pm 401.0 /\text{IU/L}$ 、 $38.5 \pm 8.8 /\text{IU/L}$ 、 $210.2 \pm 466.8 /\text{IU/L}$ 、 $42.2 \pm 30.9 /\text{IU/L}$ であった(Figure 11)。

3-5. 免疫組織化学染色による病理組織学的検討

腭切離部位のヘマトキシリン-エオジン染色をFigure 12に示している。

コントロール群では腭切離部位近傍で中等度から高度な炎症細胞浸潤が観察された。Neoveil®群、VIEWGEL®群、ハイドロゲル群ではコントロール群と比較して軽度の炎症細胞浸潤が認められた。強拡大($\times 400$)で20視野を無作為に選出し、炎症細胞数を計測した。コントロール群、Neoveil®群、VIEWGEL®群、ハイドロゲル群における炎症細胞数はそれぞれ 218.4 ± 60.2 /HPF、 101.6 ± 21.5 /HPF、 69.4 ± 14.8 /HPF、 39.2 ± 8.4 /HPFであった(Figure 12)。炎症性サイトカインであるIL-6の免疫組織化学的染色を施行すると、特にコントロール群で発現を認めた(Figure 13)。免疫染色には各群で4切片を用いた。組織切片の面積のうち、陽性反応を示した面積をグラフ化した(Figure 13)。

3-6. 膨潤試験

Figure 14はVIEWGEL®、Neoveil®、ハイドロゲルの膨潤試験の結果である。試験開始からおよそ4時間から8時間の間にいずれの物質も定常状態に達した。VIEWGEL®、Neoveil®はそれぞれ7倍程度の膨潤度を示したのに対し、ハイドロゲルは2倍程度と低膨潤であった。

3-7. アミラーゼの挙動

VIEWGEL®、Neoveil®、ハイドロゲルに対してアミラーゼがどのような挙動をとるか検証するために膜透過性試験を行った (Figure 15)。VIEWGEL®では、最外層のポリエチレンフィルムの存在によりドナーチャンバー、アクセプターチャンバーともに濃度変化は認めなかった。Neoveil®はポリグリコール酸 (PGA) を原材料とした不織布であり液体をブロックする能力には乏しく、試験開始からおよそ40分で濃度は両チャンバーで平衡状態に達した。ハイドロゲル群では、アクセプターチャンバーのアミラーゼ濃度は非常に緩徐に増加し、48時間経過時点でドナーチャンバーのアミラーゼ濃度の3.5%程度であった。

3-8. ハイドロゲル長期留置の安全性の評価

ハイドロゲルを26週間ラットの膵臓に留置して安全性の評価を行った。再開腹を行うと、ハイドロゲルは留置した部位に留まっており、遊離は認めなかった。ラットの成長に伴う膵臓の肥大が認められ、ハイドロゲルによる圧迫所見は認めたものの、明らかな傷害や壊死の所見は認めなかった (Figure 16)。1週毎に体重測定を行ったが、体重増加も問題なく、長期留置に伴う有害事象は認めなかった。

4. 考察

4-1. これまでの膵液瘻予防と新たな着想

近年、膵臓手術は術式の改良や器械の進歩により死亡率、合併症率は大幅に減少してはいるものの、依然として他の手術と比較して合併症発生率は高値であり、特に膵液瘻の発生率が高い(1-9)。膵液瘻を起こさない膵臓手術は膵臓外科医にとっての理想であるが、手術手技の改良や周術期管理の改善はほぼ限界に達しているといえる。膵液瘻は生命を脅かす合併症であり、入院期間の大幅な延長を引き起こし、医療費の増加ももたらす(25)。現在、膵液瘻を予防するため、多くの術式や新しい手術デバイスの改良、内科的アプローチとして様々な薬物療法がおこなわれている(26-28)。しかしながら、膵液瘻は依然として防ぎ得ていない。国内外において、膵液瘻予防に現在最も広く用いられているのはフィブリン接着剤シーラントとポリグリコール酸不織布(Neoveil®)の組み合わせである(29-34)。フィブリン接着剤シーラントは、膵臓の吻合部や切離部位に使用されているが、実際の効果を検証したメタアナリシスでは有意な効果は報告されていない(29-33)。また、ポリグリコール酸不織布については一部の報告では膵液瘻の発生率を低下させるとの報告はあるものの確実とはいえない(34)。これらの結果からは既存の膵液瘻予防材料では膵液瘻の根絶は不可能であることが示唆されており、全く新しい概念での膵液瘻予防法が必要であ

るといえる。これまでの方法としては、膵液瘻予防に膵臓の吻合部や切離面を完全密封することが重要と考えられてきた経緯があり、そのための試みが長年にわたってなされてきた(26-34)。しかしながら、実際に完全な密封は不可能であるため、可能な限り物理的な閉鎖を行いつつ、それでも漏出してくる膵液を吸収して保持する物質が最良と考えた。近年の基礎研究では、間葉系幹細胞シートを用いて膵切離部位の創傷治癒を促し膵液瘻を予防する研究の報告が散見されるが、癌をはじめとする悪性腫瘍の手術に使用するには残存腫瘍細胞の増殖を促し、断端再発の危険因子となり得ることから臨床での使用は現実的ではないと考える(14, 15)。我々は、皮膚科学や眼科学の分野で既に臨床的に使用され、安全性が確立されているポリビニルアルコールに着目した(17-21)。ポリビニルアルコールを有害な架橋剤を使用しない物理的架橋法である凍結融解法を用いてシート状のハイドロゲルとして新規開発を行った(35-38)。膵液瘻予防に効果的な高い柔軟性、高い引張強度、低い弾力性、低い膨潤性を持ち合わせた新規ハイドロゲル製剤を東京理科大学薬学研究科と共同開発した。

4-2. 膵液瘻ラットモデル

今回開発したハイドロゲルシートが膵液瘻予防に効果的か検証するために、膵液瘻を来す動物モデルの作製が不可欠である。田中らは、ラットの膵管は胃管、十二指腸管、総管、脾管の4つに分かれ、うち脾管の切離によりモデル動物として効果的な膵液瘻が引き起こされることを報告した(13)。我々は田中らの報告の方法を改良し、ラットの脾動静脈を剥離し、テーピングを行った後に確実に温存することで安全性の高い方法で膵実質および脾管を切離して膵液瘻を来すラットモデルを作製した。術前と術後48時間での腹水中のアミラーゼおよびリパーゼの値は著明な上昇を認めており、膵液瘻を来したことを確認した。しかし、48時間後にも腹水中の膵酵素が低値なサンプルも存在した。これは、膵切離の手技が不十分で、膵管を確実に切離できていなかったことや、腹水回収の際の限局した膵液瘻部位へ生理食塩水がうまく行き届かなかったこと、また採取した検体を測定する際の希釈や測定のテクニカルエラーに起因するものと考えた。開閉腹操作が腹水中の膵酵素上昇に寄与していないことを確認するため、開閉腹のみを施行した偽手術群においても同様に腹水中の膵酵素を比較し、膵液瘻モデルとして適切であることを十分に検討した。こうして作製した膵液瘻ラットモデルを用いて、既存の医療材料であるVIEWGEL®、

Neoveil®、そして東京理科大学薬学研究科と共同開発したハイドロゲルシートをそれぞれ用いて腓液瘻予防効果を比較し、実際にハイドロゲルシートにおいて最も高い腓液瘻予防効果が認められた。

4-3. 鹼化と炎症の抑制

脂肪細胞が腓液に暴露されると、細胞膜は障害されトリグリセリドが漏出し、石鹼のように脂肪細胞は白濁する。この過程を鹼化といい、臨床的に腓液瘻が発生した際の肉眼的所見として重要である(39,40)。本研究において、肉眼的所見としての鹼化はコントロール群、VIEWGEL®群、Neoveil®群では観察されたものの、ハイドロゲル群では観察されなかった。したがって、肉眼的にもハイドロゲル群では腓液瘻が予防されていることが示された。炎症は腓液瘻の重要な因子である(41)。術後48時間で採取した血液から炎症反応の指標として白血球数を計測した。しかし、術前と比較しても、各群で比較しても、有意差は認めなかった。同様に血清中の数酵素も測定したが、同じく術前および各群での比較で有意差は認められなかった。この結果から、腓液瘻による炎症が局所にとどまっており、全身性の炎症には及んでいないことが示唆された。組織が傷害され炎症が起きると、生体の防御反応として炎症細胞が主に血管より病巣へ遊走するが、特に初期には好中球が多く遊走する。腓切離部位近傍の炎症細胞数（好中球数）はハイドロゲル群で最も低値であり、局所の炎症も抑制できていたと考える。鹼化が発生せず、炎症細胞浸潤もわずかであることから、マクロの視点でもミクロの視点でも腓液瘻の予防効果が示唆された。

4-4. ハイドロゲルの特徴と臍液瘻予防の仕組み

私が東京理科大学薬学研究科と共同開発したハイドロゲルシートの特徴は、高い柔軟性、高い引張強度、低い弾力性、低い膨潤性である。特に今回の臍液瘻予防という観点においては、低い膨潤性が有効であった。ハイドロゲルシートの比較対照物質として使用したVIEWGEL®およびNeoveil®は膨潤試験を行うといずれも初期の7倍程度の膨潤度を示したのに対し、ハイドロゲルシートは2倍程度と低膨潤であった。この結果から、湿潤環境である腹腔内に長期留置した場合においてもハイドロゲルシートは過度に膨潤することなくその形態を維持できることがわかった。また、臍液瘻に対してそれぞれの物質が臍液をどのように遮断する、あるいは透過するのかを解明するために膜透過性試験を行った。VIEWGEL®は最外層にポリエチレンフィルムが存在し、液体を透過しない仕様であるため、実際の測定においても臍液と超純水との濃度変化は認められなかった。これは、臍の吻合部や断端を物理的に密閉することで臍液瘻を予防しようとする方法に類似していると考えられる。理論的には、完全密閉がなされれば臍液瘻は起きえないが、現実的には不可能であり、実際の臨床現場においてもこの方法では限界があることは先述の通りである。本研究においてもVIEWGEL®の臍液瘻予防効果はハイドロゲルシートにはもちろん、

Neoveil®に対しても劣っていた。原因として考えられるのは、一つはVIEWGEL®が高い弾性力を持っていることである。人体はもちろんであるが、動物においても腹腔内臓器は軟らかく、形態は複雑である。弾性力が高いと柔軟性に欠け、組織への密着が甘くなることが考えられた。もう一つは高い膨潤性にある。膨潤度が高いことにより物質そのものが原型を留めず変形してしまうことが考えられた。いずれもハイドロゲルシートが持つ低い弾力性、低い膨潤性とは対照的な性質で、臓器への密着を維持するに不利な性質となっている。対してNeoveil®はというと、膜透過性試験において約40分程度で膀胱と超純水の濃度は平衡となることより、Neoveil®には液体を遮断する、あるいは保持する、といった能力はほぼないと考えられた。したがって、膀胱瘻を起こさないよう組織の補強を行うという観点から用いられるべき材料であり、膀胱瘻が明らかな部位への貼付は予防効果に乏しいと考えられた。ハイドロゲルシートは膜透過性試験の結果から、組織から漏出した膀胱液を約24時間保持し続ける能力があることがわかった。膀胱中の α -アミラーゼの半減期は約120分である(42)。ハイドロゲルシートが膀胱液を保持している間にアミラーゼの酵素活性は低下し、最終的に漏出したとしても周囲組織への影響は軽微であると考えられた。今日まで、膀胱瘻を防止する最良の方法は吻合部と膀胱切離面の完全密閉であるとされてきた(26-34)。しかしながら、実際に完全密閉を行うことは不可能であり、これまで膀胱瘻は根絶され得なかった。本研究で開発したハイドロゲ

ルシートは、腓液瘻を起こさないよう腓切離部位を密閉に近い状態を保ちつつ、僅かに漏出した腓液も保持することで周囲への影響を最小限に抑えるという効果が期待される。ハイドロゲルシートによる効果が、これまでとは全く異なる新しい概念での腓液瘻予防法となると考えられる。

4-5. 本研究の問題点に関して

本研究において、新たに開発したハイドロゲルシートの臍液瘻予防効果を示した。腹腔内の臍酵素値という定義の上での臍液瘻の予防効果は十分に示されたものの、現在の動物モデルでは、腹腔内の炎症や全身性の敗血症、膿瘍形成、仮性動脈瘤形成と破裂などの臍液瘻に続発する合併症の評価までは及んでおらず、臨床状況を完全に反映しているとはいえない。

本研究で使用したハイドロゲルシートは非吸収性であり、体内に半永久的に遺残する。したがって、術後に腹腔内に感染を来した場合には人工物であるため再手術による摘出を考慮する必要がある。

Neoveil®との比較を行い、ハイドロゲルシートで優位性を示したが、実臨床ではネオベール単独で用いられることは少なく、フィブリン糊との組み合わせや自動縫合器との組み合わせで用いられることが多い。今後はこれらの方法で行った臍液瘻予防にさらにハイドロゲルシートを貼付して上乗せ効果を検討する実験も必要である。

ハイドロゲルシートの安全性の評価のため、26週間の長期留置モデルの観察を行ったが、臍切離を行わずにハイドロゲルシートの留置を行い、単純に毒性の評価のみとなった。条件を揃えるため、今後は臍切離を行った上でのハイドロゲルシートの留置を行い、有害事象を検討する必要がある。さらに26

週間経過した後に犠死させ、膵組織の変化を確認する。

膵液瘻予防におけるメカニズムとしてのVIEWGEL®の効果が劣っていたことの理由の一つとして、最外層にポリエチレンフィルムが存在しており、液体が不透過ということから、横方向への膵液の漏出があったことが考えられるが、その検証がなされていない。最外層に存在するポリエチレンフィルムを剥がした状態で膵切離部位に留置を行い、膵液瘻予防効果を検討する必要がある。また、最外層のポリエチレンフィルムを剥がした状態での膜透過性試験を行うことでVIEWGEL®の本体部分のアミラーゼに対する透過性が解明されればより明確にハイドロゲルとの比較が可能となる。

臨床応用を目指す際には、ラットでの実験では膵臓の形態や大きさ、膵液瘻の程度もヒトとは大きく異なるため、よりヒトに近いブタやイヌ等の大動物での実験も必要となる。実際の術式も膵頭十二指腸切除術、膵体尾部切除術により近い形で行い、シートの厚みや形状も十分に検討する必要がある。

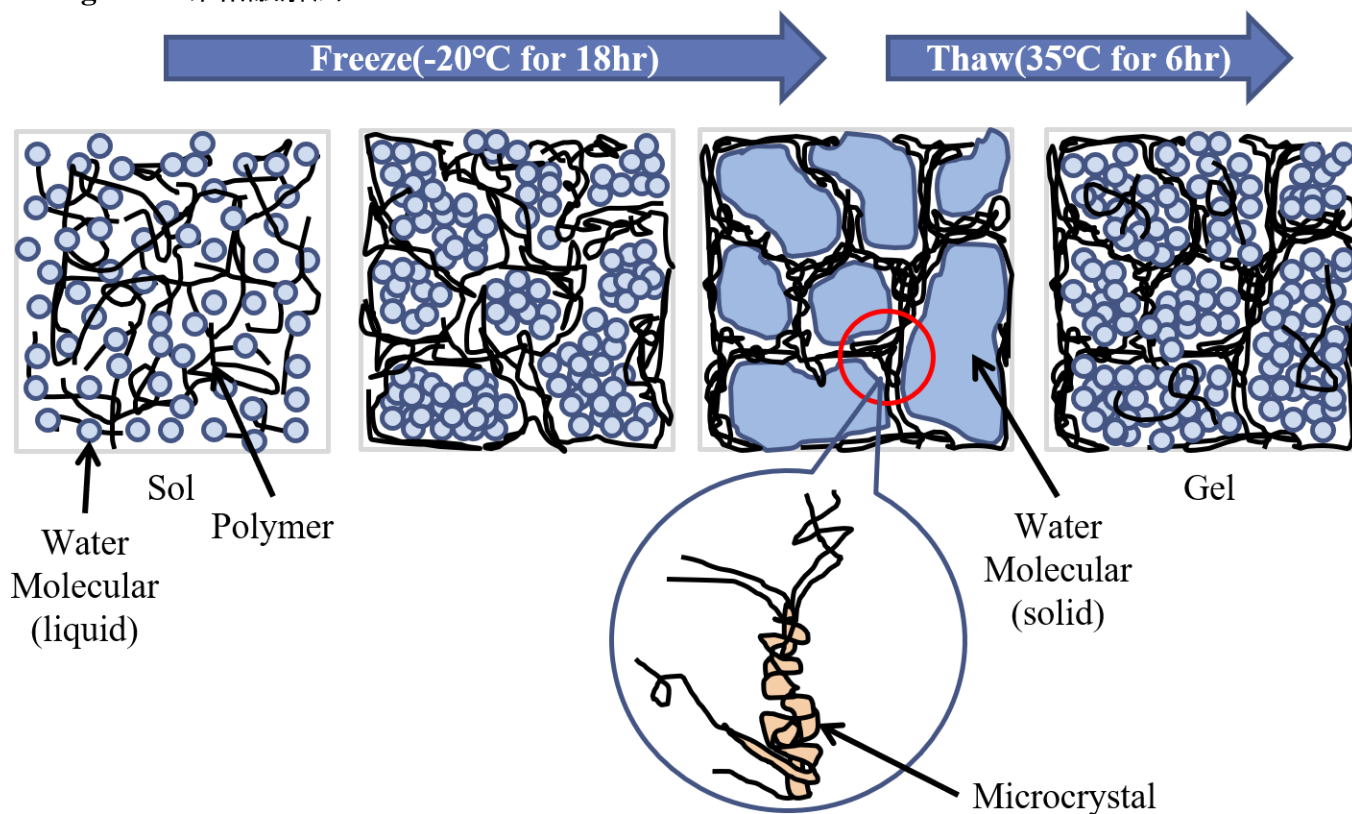
ハイドロゲルシートの保存方法は密閉容器に純水を含んだ状態で冷蔵することが基本である。臨床応用する際には、保存方法の制限や保存期間の制限が厳しくなると考えられるため、長期間使用せずに放置した場合の物性変化も検証する必要がある。

5. 結論

本研究の目的は、東京理科大学と共同開発した新規ハイドロゲルシート
の腓液瘻予防効果を検証することであった。実際にハイドロゲルシートは既存
の医療材料よりも高い効果をもって腓液瘻を予防することが示唆された。今後
は大動物での実験で効果を検証していく予定であり、臨床応用も視野に入る研
究となった。

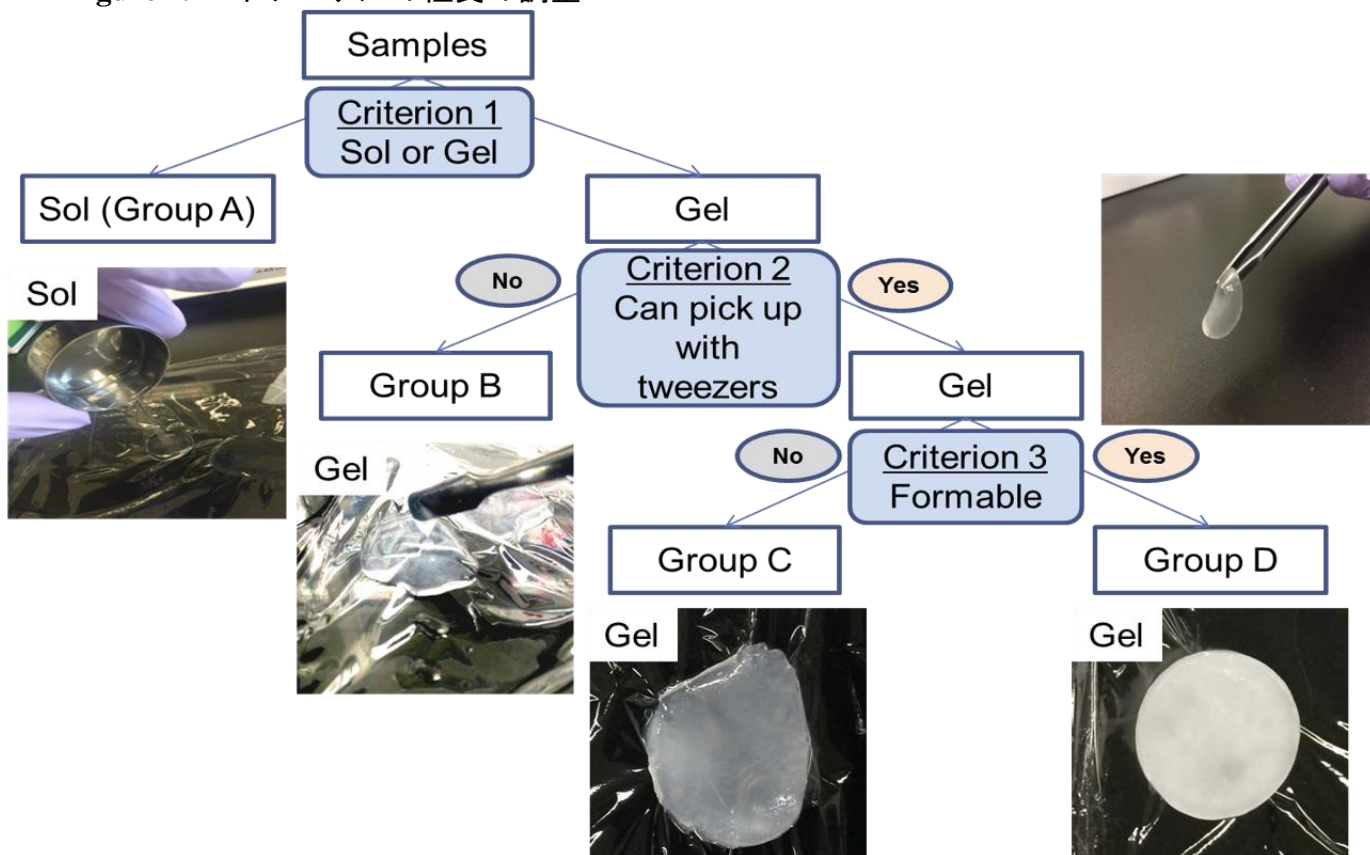
6. 図表

Figure 1. 凍結融解法



凍結融解法の原理。水溶性高分子を溶解させた溶液中には高分子と水分子が均一に分散しており（一番左の図）、この溶液を凍結させると、水分子は凝集し、氷の結晶になる（二番目、三番目の図）。高分子は水分子の凝集の外に追い出され、水分子相と高分子相の二相に分離される。高分子の濃度が高まり、高分子の微結晶化が生じ、分子鎖間で結合されて、架橋される（拡大図）。その後、融解することによって、氷の結晶は水分子に戻るが、微結晶化した高分子の架橋は維持し、架橋の空隙に水分子を保持することが可能となる。この凍結と融解の過程により、ハイドロゲルを形成する。

Figure 2. ハイドロゲルの性質の調整



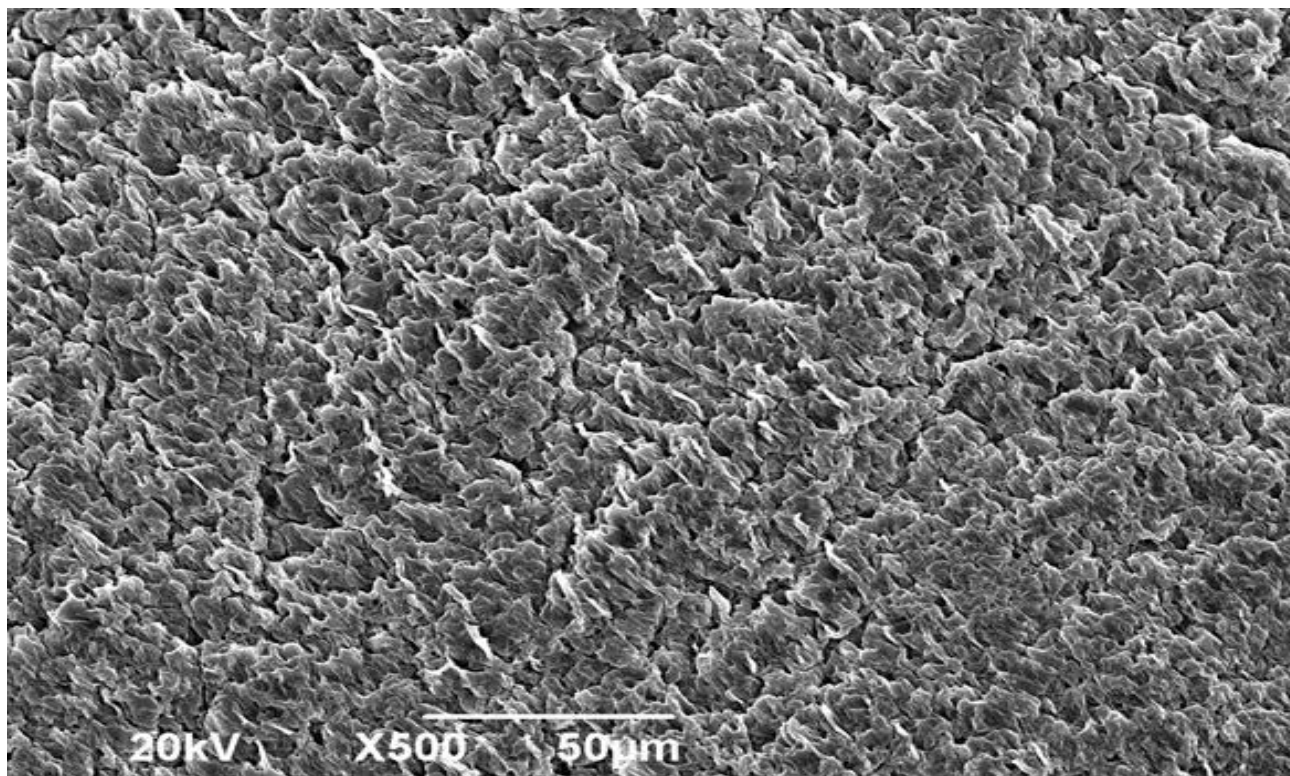
濃度とサイクル数でハイドロゲルをA-Dの4つの群に分類した。1つ目の条件はゾル状となるかゲル状となるか、2つ目は鑷子で把持可能か否か、3つ目は狙った形に形成可能か否か、である。

Table 1. ハイドロゲルの性質

Exceval [®]				
濃度 (w/v%)	サイクル数			
	1	2	3	4
2.5	B	C	C	D
5.0	B	D	D	D
7.5	D	D	D	D
10.0	D	D	D	D

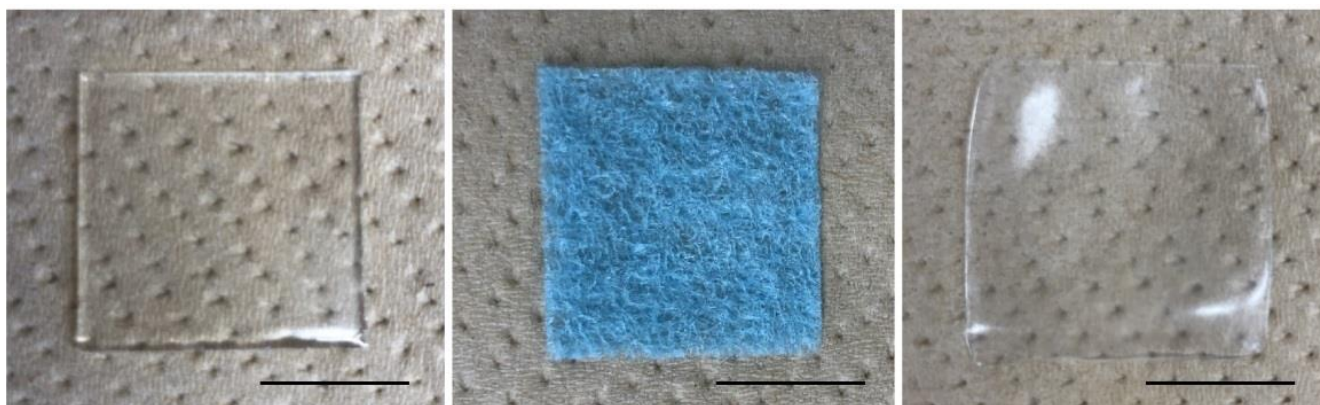
濃度とサイクル数が増加することで実験に用いることができるD群のハイドロゲルが調製できた。

Figure 3. ハイドロゲルの電子顕微鏡写真



ポリビニルアルコール間の密な架橋が観察された。

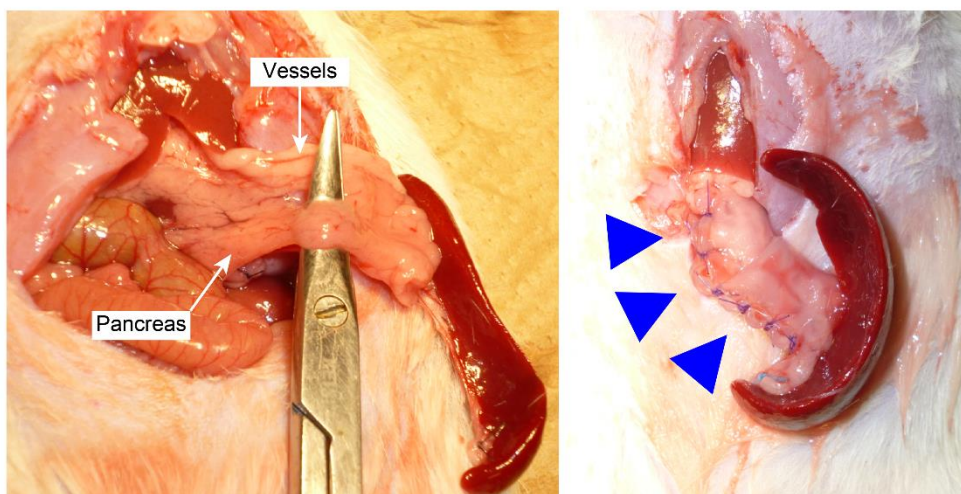
Figure 4. 本研究で用いた物質



VIEWGEL® (左), Neoveil® (中央), ハイドロゲルシート (右)。

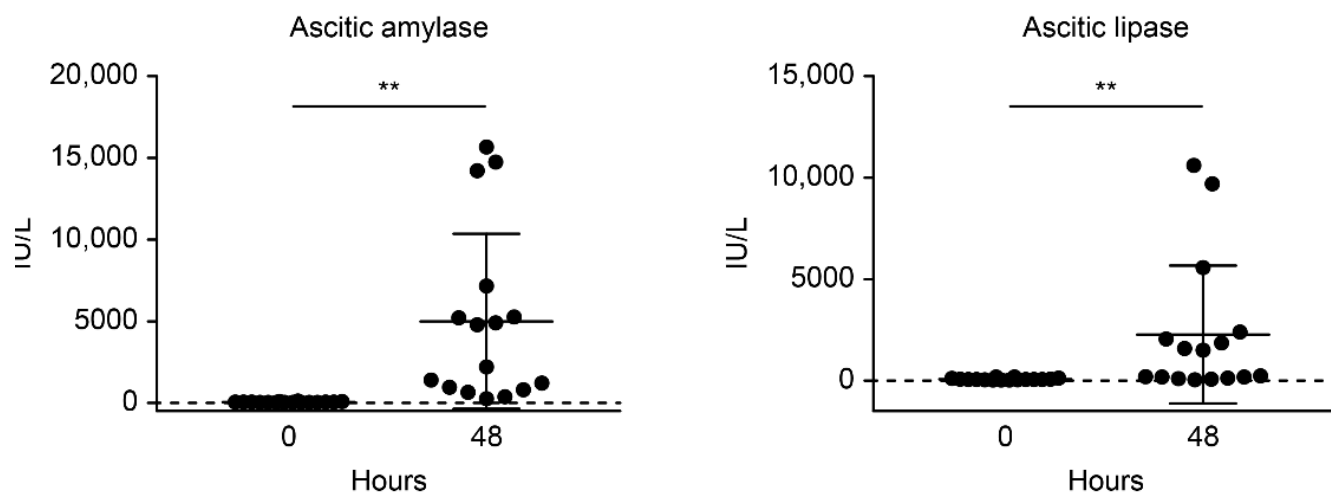
Scale bar = 10 mm.

Figure 5. 膵液瘻ラットモデルの作製とハイドロゲルシートの貼付



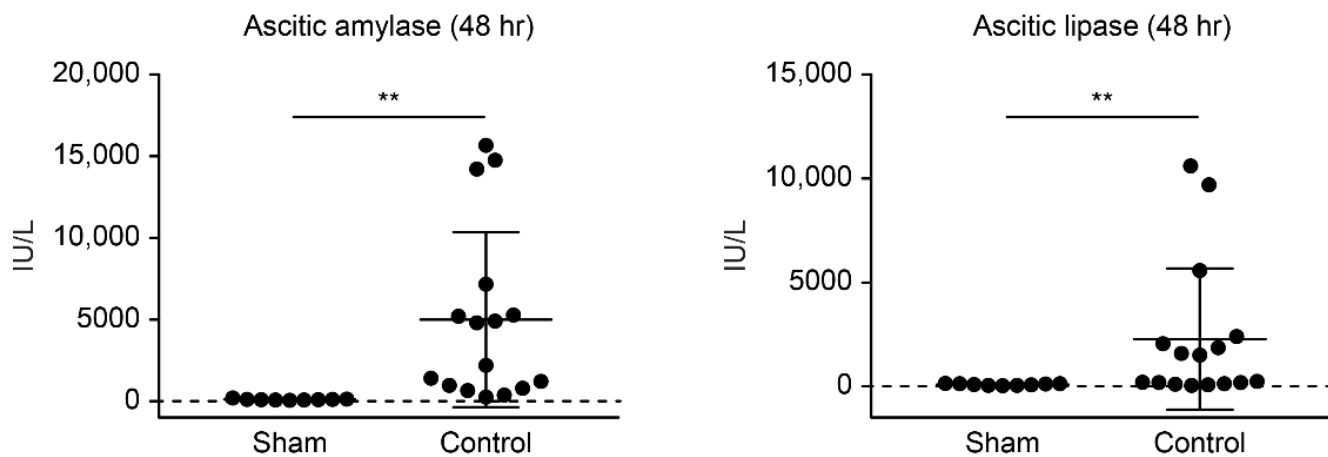
膵臓と脾臓を授動の後に、脾動静脈を背側に温存しつつ膵実質および内部を走行する膵管（脾管）を切離した（左）。ハイドロゲルシートを貼付し、縫合糸で固定した（右）。

Figure 6. 開腹時と術後48時間での腹水中の膵酵素の比較



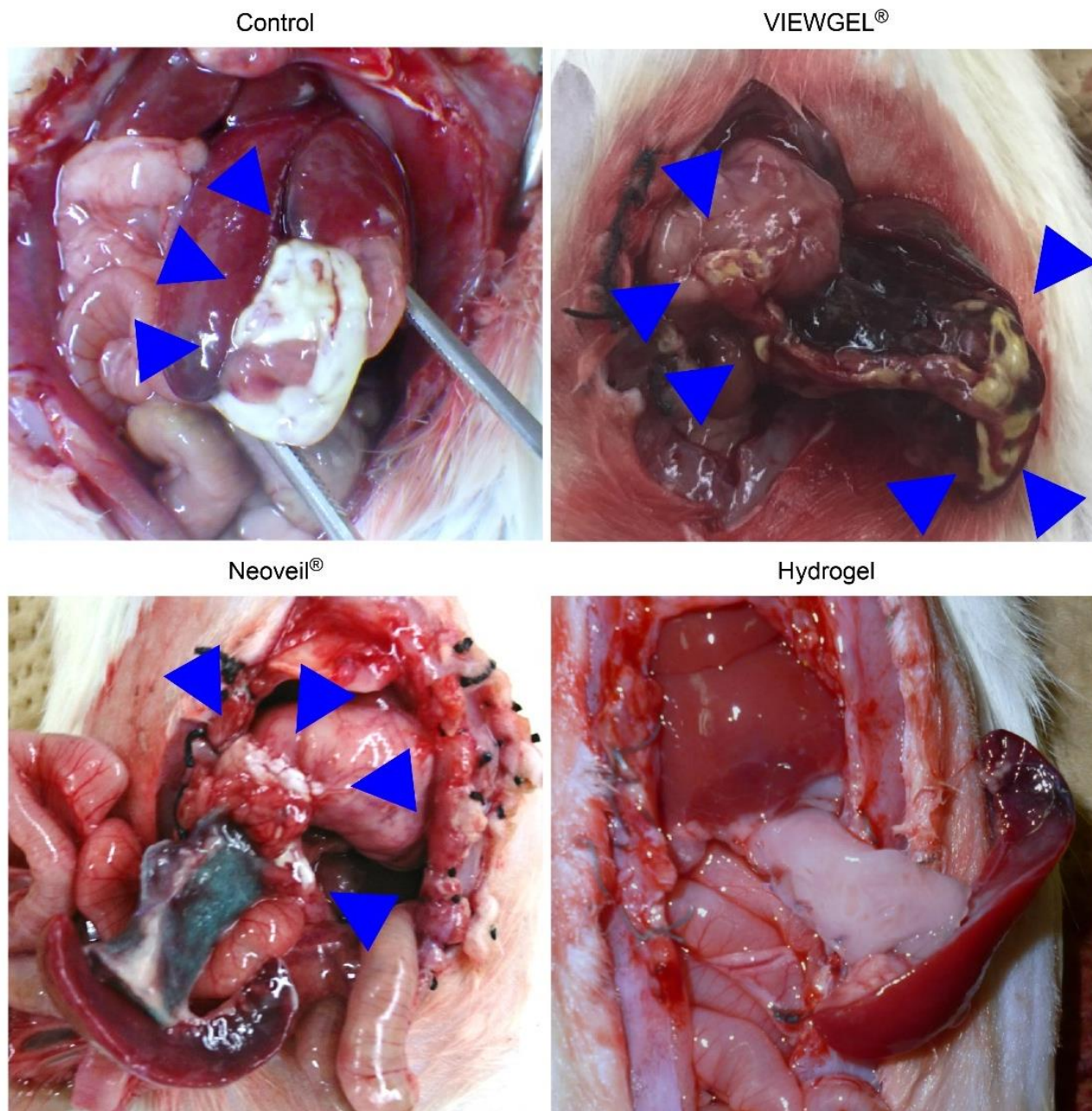
初回開腹時の膵切離を行う前と術後48時間の腹水中の膵酵素の値。
値は平均±SDで表示し、2群間の比較はMann-Whitney U testを用いた(** p < 0.01)。

Figure 7. 偽手術群との比較



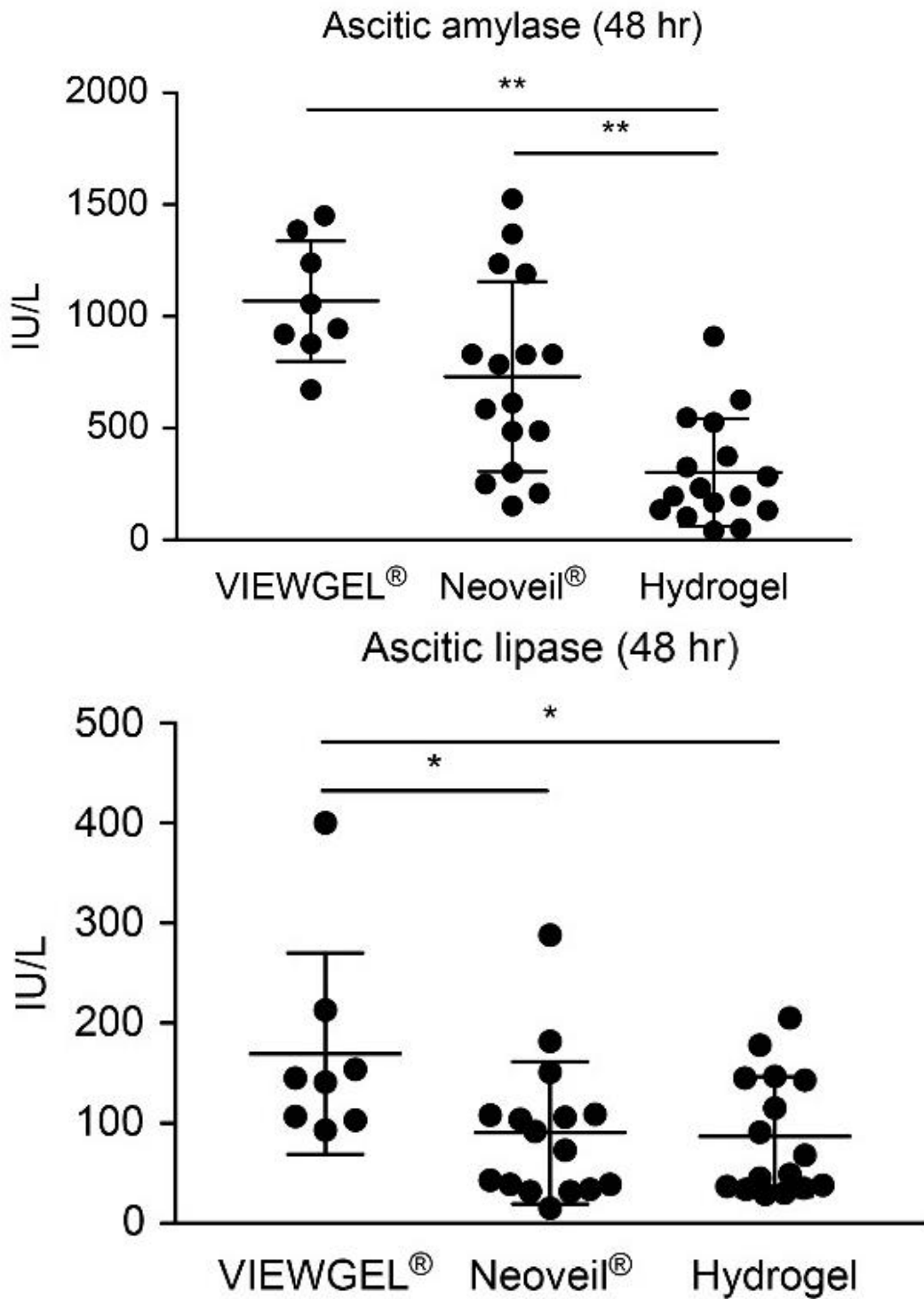
術後48時間での偽手術群とコントロール群の腹水中の膵酵素の値。
値は平均±SDで表示し、2群間の比較はMann-Whitney U testを用いた(** p < 0.01)。

Figure 8. VIEWGEL®、Neoveil®、ハイドロゲルシートの肉眼的膵液瘻予防効果



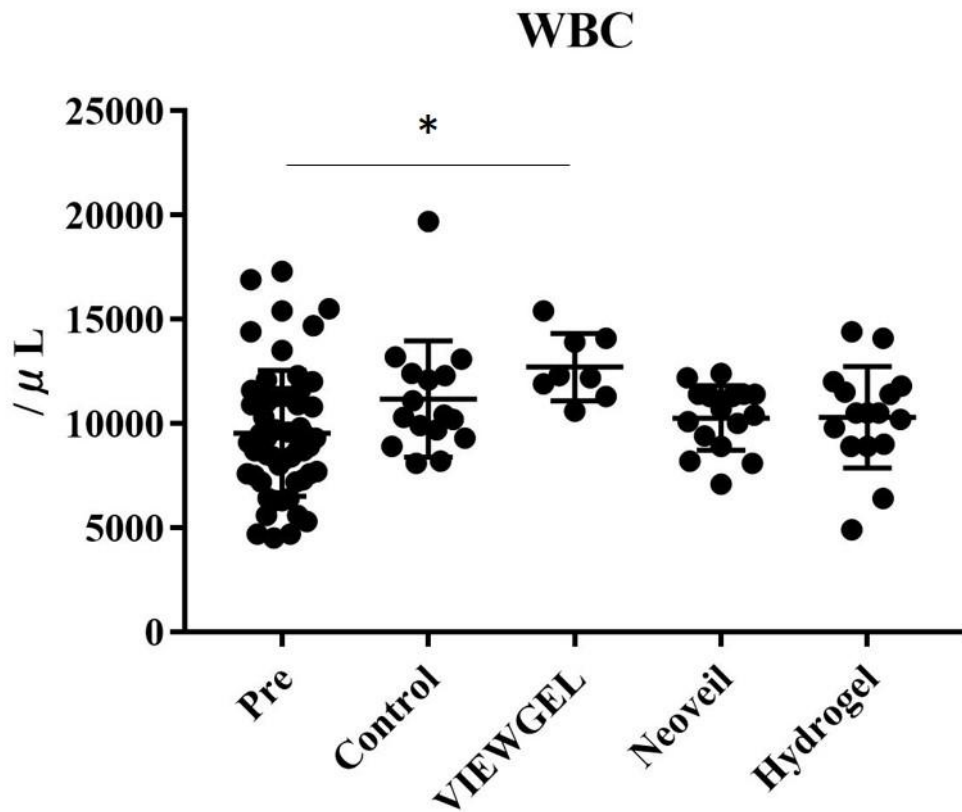
術後48時間の各群の肉眼所見。ハイドロゲル群を除いたコントロール群、VIEWGEL®群、Neoveil®群において膵周囲の脂肪織の鹼化の所見を認める。

Figure 9. VIEWGEL®、Neoveil®、ハイドロゲルシートの膵液瘻予防効果



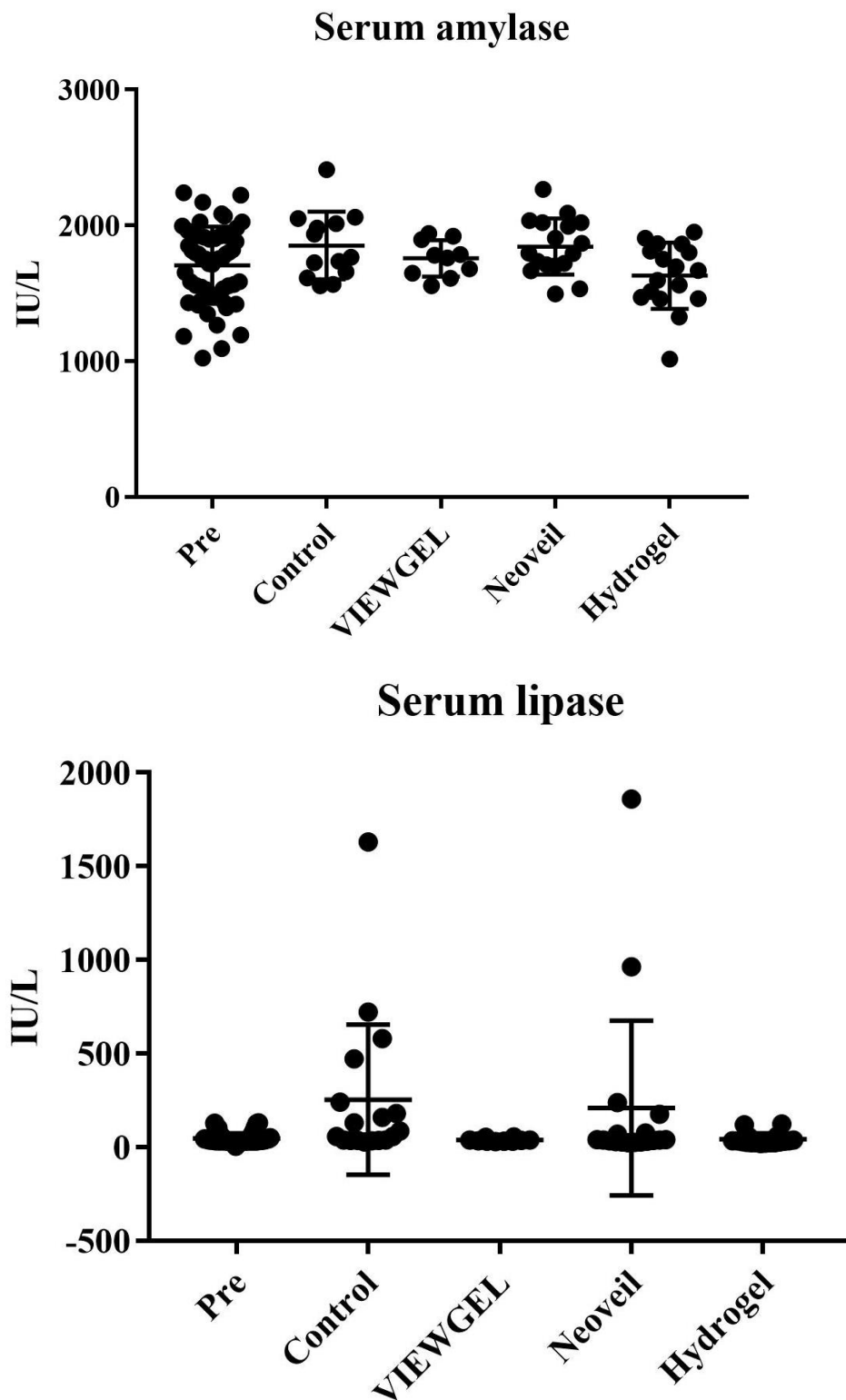
術後48時間の各群の腹水中の膵酵素の値。値は平均±SDで表示し、3群間の比較はone-way ANOVAを用いて行った(* p < 0.05, ** p < 0.01)。

Figure 10. 末梢血中の白血球数の比較



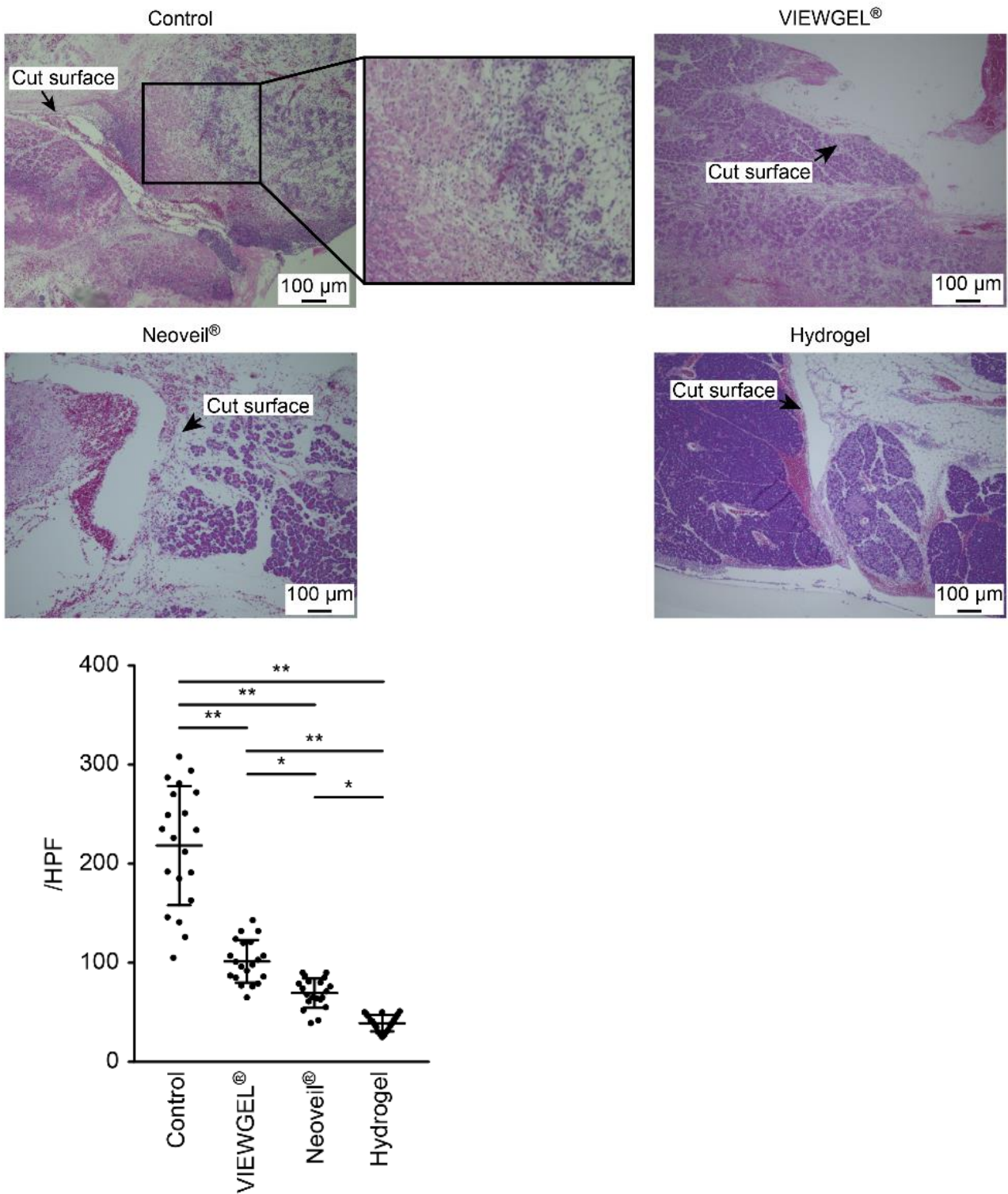
術前および48時間後に各群で末梢血中の白血球数を測定した。
値は平均±SDで表示し、3群間の比較はone-way ANOVAを用いて行った(* $p < 0.05$)。

Figure 11. 血清中の膵酵素の比較



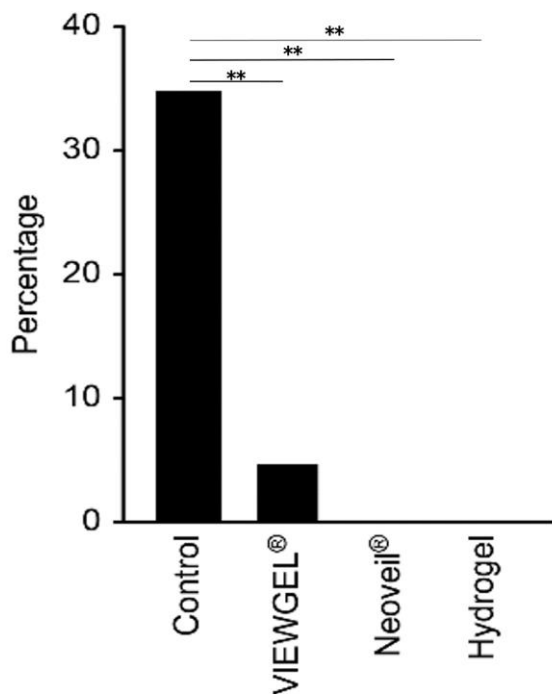
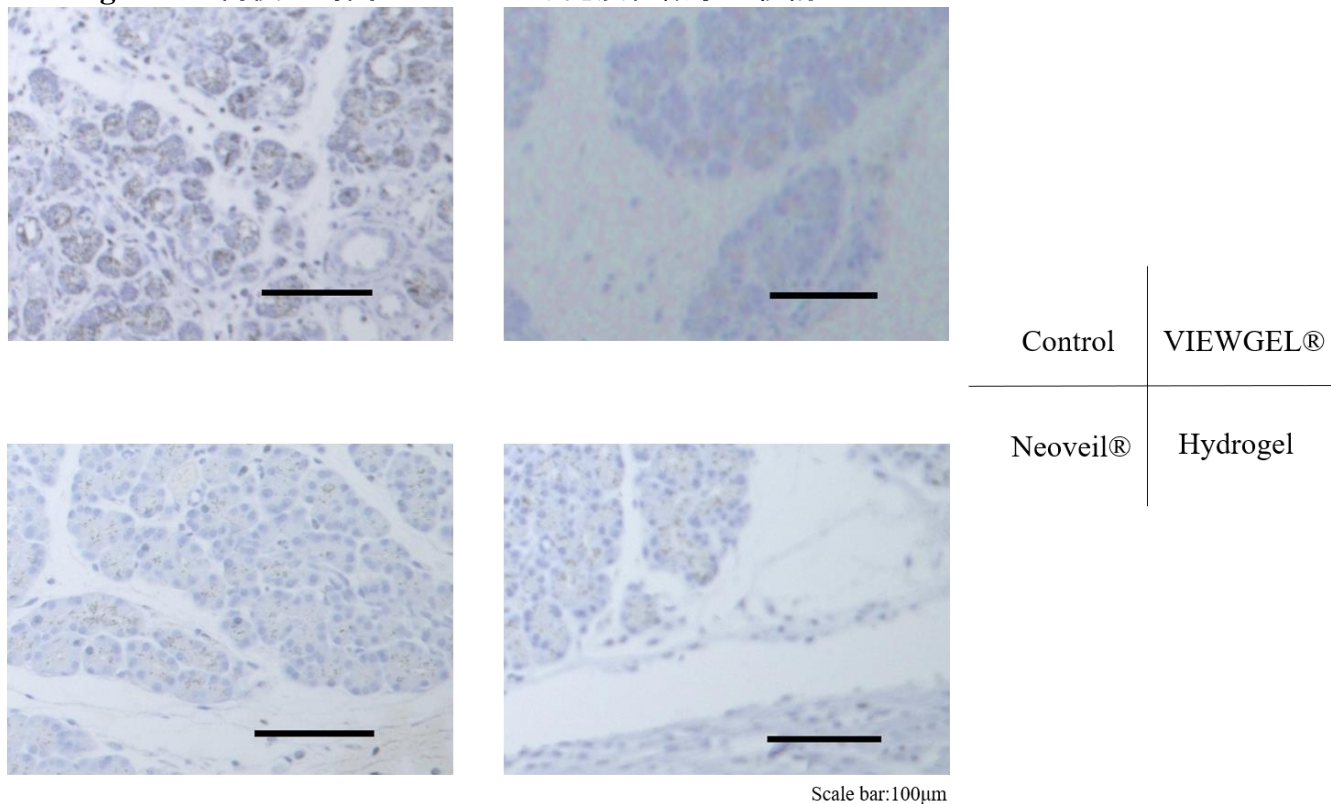
術前および48時間後に各群で血清中の膵酵素を測定した。
値は平均±SDで表示し、5群間の比較はone-way ANOVAを用いて行った（有意差なし）。

Figure 12. 術後48時間の膵組織の病理組織学的評価と炎症細胞浸潤



膵切離部位のヘマトキシリン-エオジン染色の組織像。
無作為に選出された20視野(×400)での炎症細胞数。値は平均±SDで表示し、4群間の比較は one-way ANOVAを用いて行った(* p < 0.05, ** p < 0.01)。

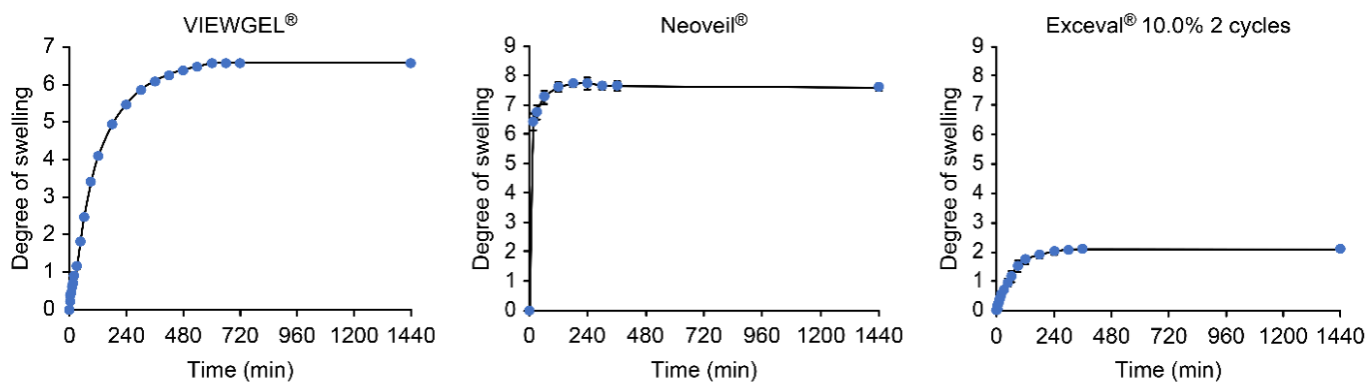
Figure 13. 術後48時間のIL-6による免疫組織学的検討



IL-6を用いた免疫組織化学染色像。

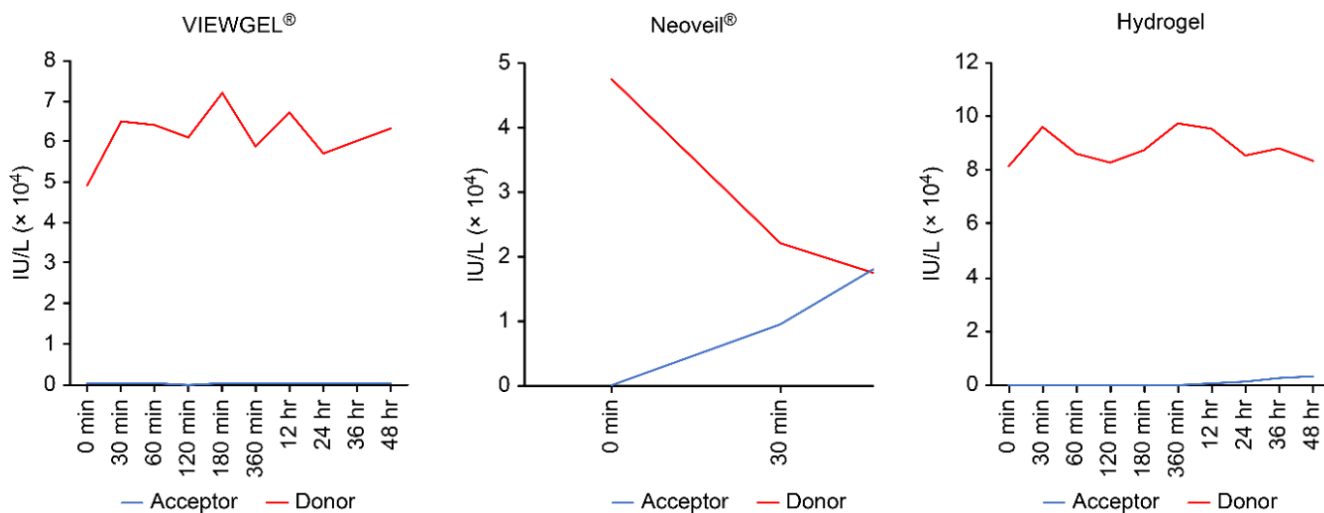
各群のIL-6陽性となった領域の全体に対する面積の割合をグラフに示す(** p < 0.01)。

Figure 14. 膨潤試験



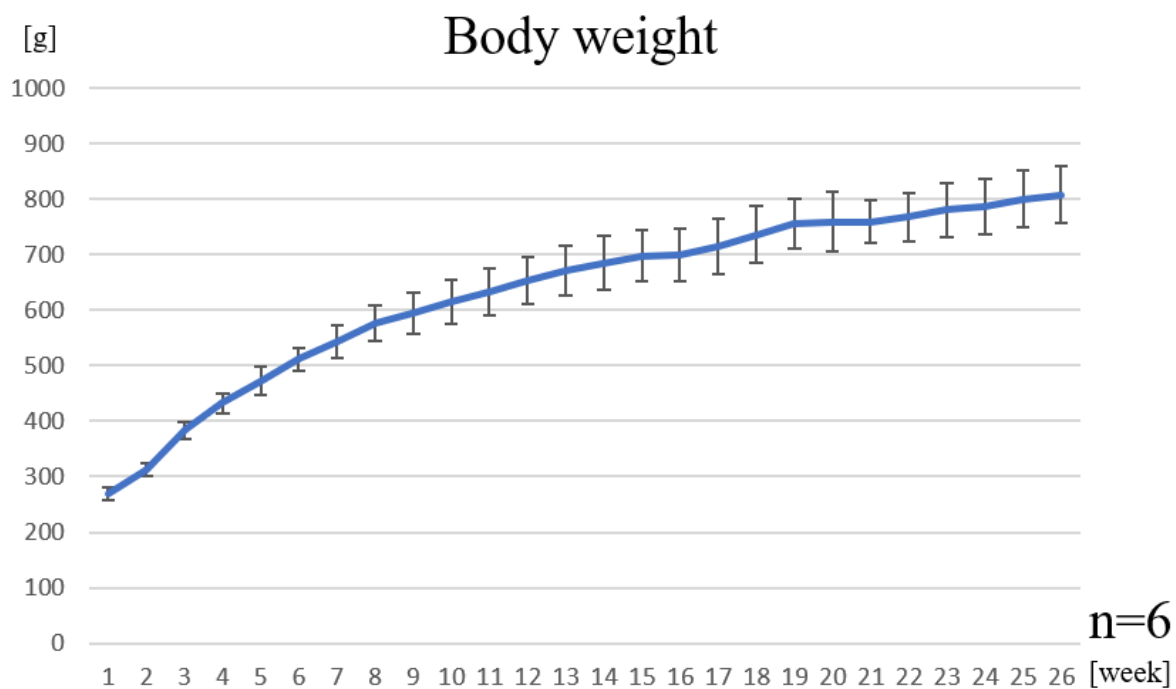
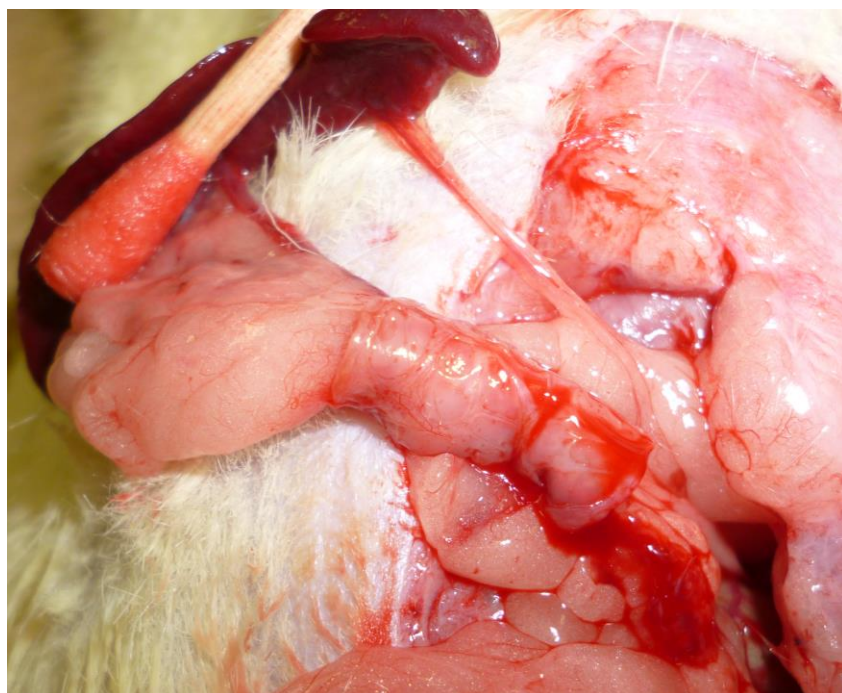
VIEWGEL® (左), Neoveil® (中央), ハイドロゲルシート(右)の膨潤試験の結果。経時的な膨潤度を確立された計算式でプロットした。

Figure 15. 膜透過性試験



VIEWGEL® (左), Neoveil® (中央), ハイドロゲルシート(右)の膜透過性試験の結果。赤線はドナーチャンバー内のアミラーゼ濃度を示し、青線はアクセプターチャンバー内のアミラーゼ濃度を示す。VIEWGEL®では、アクセプターチャンバーのアミラーゼ濃度の増加は認めなかった。Neoveil®では、アミラーゼ濃度がドナーチャンバーとアクセプターチャンバーの間において短時間で平衡に達した。ハイドロゲルシートでは、アクセプターチャンバー内のアミラーゼ濃度は漸増した。

Figure 16. ハイドロゲル長期留置の影響



上図はラットの膵臓にハイドロゲルを留置し26週経過後に開腹を行った際の所見である。ラットの成長に伴い、膵臓は圧迫されているが傷害や壊死の所見は認めていない。下図は週毎の体重の変化である(平均±標準偏差)。

7. 謝辞

本研究は、著者が筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻博士課程在学中に、同大学人間総合科学研究科大河内信弘教授（現客員教授）ならびに小田竜也教授のもとに行ったものです。このような研究の機会を与えていただいた両教授、ならびに日頃の研究において指導、助言、助力をいただいた同研究室の田村孝史先生、久倉勝治先生、大和田洋平先生、小澤佑介先生、清水義夫先生に感謝申し上げます。

また、ハイドロゲルの開発ならびに調製に関して御協力頂いた東京理科大学薬学研究科の花輪剛久先生、河野弥生先生、儘田大先生、石川葉月先生に感謝申し上げます。

8. 出典

本学位論文ではJournal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences. 2020
(doi:10.1002/JHBP.867)に掲載された論文の内容を、Wiley社の規定にしたがって再利用
している。

9. 参考文献

1. Bassi C, Dervenis C, Butturini G, Fingerhut A, Yeo C, Izbicki J, et al. Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. *Surgery*. 2005;138:8–13.
2. Büchler MW, Friess H, Wagner M, Kulli C, Wagener V, Z'Graggen K. Pancreatic fistula after pancreatic head resection. *Br J Surg*. 2000;87:883–9.
3. Fahy BN, Frey CF, Ho HS, Beckett L, Bold RJ. Morbidity, mortality, and technical factors of distal pancreatectomy. *Am J Surg*. 2002;183:237–41.
4. Christein JD, Kendrick ML, Iqbal CW, Nagorney DM, Farnell MB. Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *J Gastrointest Surg*. 2005;9:922–7.
5. Knaebel HP, Diener MK, Wente MN, Büchler MW, Seiler CM. Systematic review and meta-analysis of technique for closure of the pancreatic remnant after distal pancreatectomy. *Br J Surg*. 2005;92:539–46.
6. Velanovich V. Case-control comparison of laparoscopic versus open distal pancreatectomy. *J Gastrointest Surg*. 2006;10:95–8.
7. Akamatsu N, Sugawara Y, Komagome M, Shin N, Cho N, Ishida T, et al. Risk factors for postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy: the significance of the ratio of the main pancreatic duct to the pancreas body as a predictor of leakage. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010;17:322–8.
8. Schoellhammer HF, Fong Y, Gagandeep S. Techniques for prevention of pancreatic leak after pancreatectomy. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3:276–87.
9. Liang S, Hameed U, Jayaraman S. Laparoscopic pancreatectomy: indications and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2014;20:14246–54.

10. van Berge Henegouwen MI, De Wit LT, Van Gulik TM, Obertop H, Gouma DJ. Incidence, risk factors, and treatment of pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy: drainage versus resection of the pancreatic remnant. *J Am Coll Surg.* 1997;185:18–24.
11. Butturini G, Daskalaki D, Molinari E, Scopelliti F, Casarotto A, Bassi C. Pancreatic fistula: definition and current problems. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008;15:247–51.
12. Uzbas F, May ID, Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Perkins AD, et al. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2015;11:298–308.
13. Tanaka T, Kuroki T, Adachi T, Ono S, Kitasato A, Hirabaru M, et al. Development of a novel rat model with pancreatic fistula and the prevention of this complication using tissue-engineered myoblast sheets. *J Gastroenterol.* 2013;48:1081–9.
14. Kaneko H, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Yamamoto T, Shibata R, et al. Novel therapy for pancreatic fistula using adipose-derived stem cell sheets treated with mannose. *Surgery.* 2017;161:1561–9.
15. Kim SR, Yi HJ, Lee YN, Park JY, Hoffman RM, Okano T, et al. Engineered mesenchymal stem-cell-sheets patches prevents postoperative pancreatic leakage in a rat model. *Sci Rep.* 2018;8:360.
16. Balcom JHT, Keck T, Warshaw AL, Graeme-Cook F, Fernández-del Castillo C. Prevention of pancreatic fistula with a new synthetic, absorbable sealant: evaluation in a dog model. *J Am Coll Surg.* 2002;195:490–6.
17. Kamoun EA, Kenawy ES, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res.* 2017;8:217–33.
18. Suhaeri M, Noh MH, Moon JH, Kim IG, Oh SJ, Ha SS, et al. Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. *Theranostics.* 2018;8:5025–38.
19. Fan L, Yang H, Yang J, Peng M, Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA

- hydrogel for wound dressings. *Carbohydr Polym.* 2016;146:427–34.
20. Baghaie S, Khorasani MT, Zarrabi A, Moshtaghian J. Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017;28:2220–41.
 21. Ahmed AS, Mandal UK, Taher M, Susanti D, Jaffri JM. PVA-PEG physically cross-linked hydrogel film as a wound dressing: experimental design and optimization. *Pharm Dev Technol.* 2018;23:751–60.
 22. Xiaoni Zhan, Femgrui Li, Qiaohong Chu, Hao Pang. Secretogranin III may be an indicator of paraquat-induced astrocyte activation and affects the recruitment of BDNF during this process. *Int J Mol Med.* 2018; 42: 3622-3630.
 23. Christian König, Eric Morch, Annett Eitner, Christian Möller, Brian Turnquist, Hans-Georg Schaible, et al. Involvement of Spinal IL-6 Trans-Signaling in the Induction of Hyperexcitability of Deep Dorsal Horn Neurons by Spinal Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Neurosci.* 2016 21; 36: 9782-91
 24. Buckley ST, Fischer SM, Fricker G, Brandl M. *In vitro* models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45:235–50.
 25. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240:205–13.
 26. Choi SB, Lee JS, Kim WB, Song TJ, Suh SO, Choi SY. Efficacy of the omental roll-up technique in pancreaticojejunostomy as a strategy to prevent pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *Arch Surg.* 2012;147:145–50.
 27. Matsusue S, Takeda H, Nakamura Y, Nishimura S, Koizumi S. A prospective analysis of the factors influencing pancreaticojejunostomy performed using a single method, in 100 consecutive pancreaticoduodenectomies. *Surg Today.* 1998;28:719–26.
 28. Kuroki T, Tajima Y, Tsutsumi R, Tsuneoka N, Fukuda K, Haraguchi M, et al. Gastric wall-

covering method for the prevention of pancreatic fistula after pancreatic resection.

Hepatogastroenterology. 2007;54:935–6.

29. Kram HB, Clark SR, Ocampo HP, Yamaguchi MA, Shoemaker WC. Fibrin glue sealing of pancreatic injuries, resections, and anastomoses. *Am J Surg*. 1991;161:479–81; discussion 82.
30. D'Andrea AA, Costantino V, Sperti C, Pedrazzoli S. Human fibrin sealant in pancreatic surgery: it is useful in preventing fistulas? A prospective randomized study. *Ital J Gastroenterol*. 1994;26:283–6.
31. Suzuki Y, Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, Tanioka Y, Kawamura T, et al. Fibrin glue sealing for the prevention of pancreatic fistulas following distal pancreatectomy. *Arch Surg*. 1995;130:952–5.
32. Suc B, Msika S, Fingerhut A, Fourtanier G, Hay JM, Holmières F, et al. Temporary fibrin glue occlusion of the main pancreatic duct in the prevention of intra-abdominal complications after pancreatic resection: prospective randomized trial. *Ann Surg*. 2003;237:57–65.
33. Orci LA, Oldani G, Berney T, Andres A, Mentha G, Morel P, et al. Systematic review and meta-analysis of fibrin sealants for patients undergoing pancreatic resection. *HPB (Oxford)*. 2014;16:3–11.
34. Jang JY, Shin YC, Han Y, Park JS, Han HS, Hwang HK, et al. Effect of polyglycolic acid mesh for prevention of pancreatic fistula following distal pancreatectomy: a randomized clinical trial. *JAMA Surg*. 2017;152:150–5.
35. Akhtar MF, Hanif M, Ranjha NM. Methods of synthesis of hydrogels. A review. *Saudi Pharm J*. 2016;24:554–9.
36. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:13–36.
37. Zhang H, Zhang F, Wu J. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze–thaw technique. *React Funct Polym*. 2013;73:923–8.
38. Holloway JL, Lowman AM, Palmese GR. The role of crystallization and phase separation in the

formation of physically cross-linked PVA hydrogels. *Soft Matter*. 2013;9:826–33.

39. Hafezi-Nejad N, Fishman EK, Zaheer A. Imaging of post-operative pancreas and complications after pancreatic adenocarcinoma resection. *Abdom Radiol (NY)*. 2018;43:476–88.
40. Chiba N, Abe Y, Yokozuka K, Hikita K, Kobayashi T, Sano T, et al. Surgical technique of pancreatic parenchyma transection-delayed approach (PPTDA) in hepatopancreatoduodenectomy for hilar cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2019;23:613–6.
41. De Schryver N, Wittebole X, Hubert C, Gigot JF, Laterre PF, Castanares-Zapatero D. Early hyperlactatemia predicts pancreatic fistula after surgery. *BMC Anesthesiol*. 2015;15:109.
42. Apple F, Benson P, Preese L, Eastep S, Bilodeau L, Heiler G. Lipase and pancreatic amylase activities in tissues and in patients with hyperamylasemia. *Am J Clin Pathol*. 1991;96:610–4.